

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15008

研究課題名（和文）上皮細胞傷害性を有する腸内細菌による大腸がん発生機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of colorectal cancer development by intestinal bacteria with epithelial cytotoxicity

研究代表者

辻 竣也（Tsuji, Shunya）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80898370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新型コロナウイルス感染症における腸内細菌叢の乱れと、大腸癌発症の関連を明らかにすることを目的として開始したが、実際にマウス等の実験動物の腸内細菌の異常は検出できなかった。しかしながら、本研究の過程で、新型コロナウイルスが感染する主要な臓器である肺において、細胞老化と呼ばれる現象が引き起こされ、ウイルスが体内から排除された後も持続する炎症反応の原因の1つとなつていることを明らかにした。このような現象は、現在世界的に問題となつているLong COVIDと呼ばれる、COVID-19から回復した後も続く後遺症の病態の一端となつている可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は2019年12月に発生した新興感染症であり、回復した人の10%程度で後遺症が残り、1年以上もその症状が持続してしまうことが問題となつているが、依然としてその原因は明らかになつていない。本研究ではSARS-CoV-2感染により誘導される老化細胞がその原因となつている可能性を明らかにすることができた点で大きな社会的な意義があると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we started with the aim of clarifying the relationship between the disturbance of the gut microbiota in the SARS-CoV-2 (severe acute respiratory coronavirus 2) infection and the development of colon cancer. As a result, we did not detect any disturbance in gut microbiota after SARS-CoV-2 infection. However, during the course of this research, a phenomenon called cellular senescence was induced in the lungs, which are the main organs infected by the SARS-CoV-2, and became one of the causes of the inflammatory response that persisted even after the virus was eliminated from the body. It was made clear that such a phenomenon may be part of the pathological condition of sequelae that continues even after recovery from COVID-19, called Long COVID, which is currently a global problem.

研究分野：感染症

キーワード：SARS-CoV-2 細胞老化 SASP 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第1位はがんであり、その中でも大腸がんは罹患者総数が第1位、死亡者数が第2位と多く、病態の解明や新たな治療法の開発が求められている疾患である。近年、腸内細菌叢の変化が大腸がんの発生に関与することが明らかになってきた。実際に、大腸がん患者の糞便を移植した大腸がんモデルマウス（発がん誘導物質 azoxymethane (AOM) 投与マウス）では、大腸がんの発生頻度が上昇することが報告された (Sunny H Wong et al, *Gastroenterology*, 2017)。さらに、がん抑制遺伝子 APC 変異マウスや AOM 投与マウスに、polyketide synthase (pks) + *Escherichia coli*, Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) などの腸内細菌を経口投与すると腫瘍形成が促進されることも報告されている (Christine M. Dejea et al, *Science*, 2018)。しかし、野生型の健康なマウスではこれらの細菌を経口投与しても腫瘍形成が促進されないことが知られており、発がんの初期にはこれらの発がん誘導性の腸内細菌以外の刺激が必要であることが推測できる。また、発がんモデルマウスは、腸管バリア機構の低下が認められており、腸管バリアの破損は腸内細菌が発がんを誘導するうえで必須であると考えられる。しかし、現在、腸管上皮細胞を傷害し、バリア機構を低下させる腸内細菌は報告されていない。

本研究では、腸管バリア機構の破綻を引き起こす腸内細菌の同定・機能解明、および、大腸がん発生との関連性を明らかにすることを目的とした。しかし、研究開始直前に、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のパンデミックが起こった。SARS-CoV-2 は急性の呼吸感染症を引き起こすが、ヒトでは、発生当初より腸管にも感染し、dysbiosis を起こすことが報告されていた。世界情勢を鑑みて我々は SARS-CoV-2 が引き起こす dysbiosis と、大腸がんの発生に関連がないかを調べることにした。

2. 研究の目的

SARS-CoV-2 感染が引き起こす腸内細菌叢の乱れと、大腸がん発生の関連の解明。

3. 研究の方法

市中感染株である SARS-CoV-2 (武漢型、イギリス型) を4週齢、雄、syrian hamster をイソフルランにて麻酔し、 5×10^5 FFU で経鼻感染させた。非感染群として等量の PBS を経鼻投与した。感染前、感染後3日目、14日目に糞便を採取、感染後3日目、14日目、45日目に肺、腸管から RNA および組織サンプルを回収した。糞便は 16S シーケンスを行い、腸内細菌叢の変化が認められるかを検討した。また、組織サンプルは 4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋し、SARS-CoV-2 の nucleocapsid protein の抗体にて免疫組織染色を行い感染の確認をおこなった。さらに肺、腸管から回収した RNA は Real-time qPCR を行い、SARS-CoV-2 の感染が認められるか、さらには細胞老化や炎症反応が認められるかなど包括的な解析をおこなった。

4. 研究成果

はじめに、肺や腸管における Real-time qPCR (RT-qPCR) の結果、SARS-CoV-2 は肺での増幅が認められるのに対し、腸管での増幅は全く認められなかった。さらに、菌叢解析の結果、SARS-CoV-2 感染はハムスターの腸内細菌叢に大きな変化は認められず、ヒトの病態とは異なる可能性が示唆された。しかしながら、この実験の過程で、SARS-CoV-2 は肺に著しく感染することが RT-qPCR、および免疫組織染色で認められた (図1、2)。さらに、肺においては細胞老化のマーカー遺伝子である p16 の発現が、感染後14日目以降に上昇することを見出した (図3)。そこで、我々は SARS-CoV-2 の感染により感染局所に細胞老化が誘導されている可能性があると考えた。細胞老化は、正常な細胞が修復不能な DNA ダメージや強いサイトカインの刺激を受けた際に、細胞周期チェックポイント因子である p16INK4a や p21Cip1 の働きにより、不可逆的に細胞周期を停止する現象であり、アポトーシスを起こした細胞と並び、異常を起こした細胞が増殖しないようにする重要ながん抑制機構である。しかし、細胞老化を起こした細胞 (老化細胞) は、アポトーシスを起こした細胞とは異なり、速やかに体内から排除されるわけではなく、加齢と共にあらゆる臓器に蓄積していくことが知られている。このような老化細胞は、senescence associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれ、種々の炎症性サイトカインやケモカイン、成長因子、タンパク質分解酵素などを分泌するようになり、蓄積した臓器に慢性的な炎症反応を引き起こすことが知られている。そこで、SARS-CoV-2 感染後の肺において、細胞老化に関連する炎症反応の持続が見られるかを検討したところ、感染後45日経っても、依然として細胞老化マーカーの p16 発現が高いままであり、相関するよういくつかの炎症性サイトカインやケモカインの発現が高いままであることが認められた (図4)。以上の結果から、SARS-CoV-2 感染後に出現する老化細胞は、ウイルスが体内から排除された後も長期的に体内に居座り、SASP 因子を分泌していることが示唆された (Tsuji et al, *Nature Aging*, 2021)。

これまで、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 患者では 10%以上で Long COVID と呼ばれる後遺症が持続してしまうことが報告され、社会的に大きな問題となっている。Long COVID

の発症には SARS-CoV-2 感染後、ウイルスが排除されてしまった後も続く、慢性的な炎症反応が一因であることが報告されているが、その原因は明らかにされていなかった。我々の研究結果は、Long COVID の原因の一端となっている可能性があると考えている。

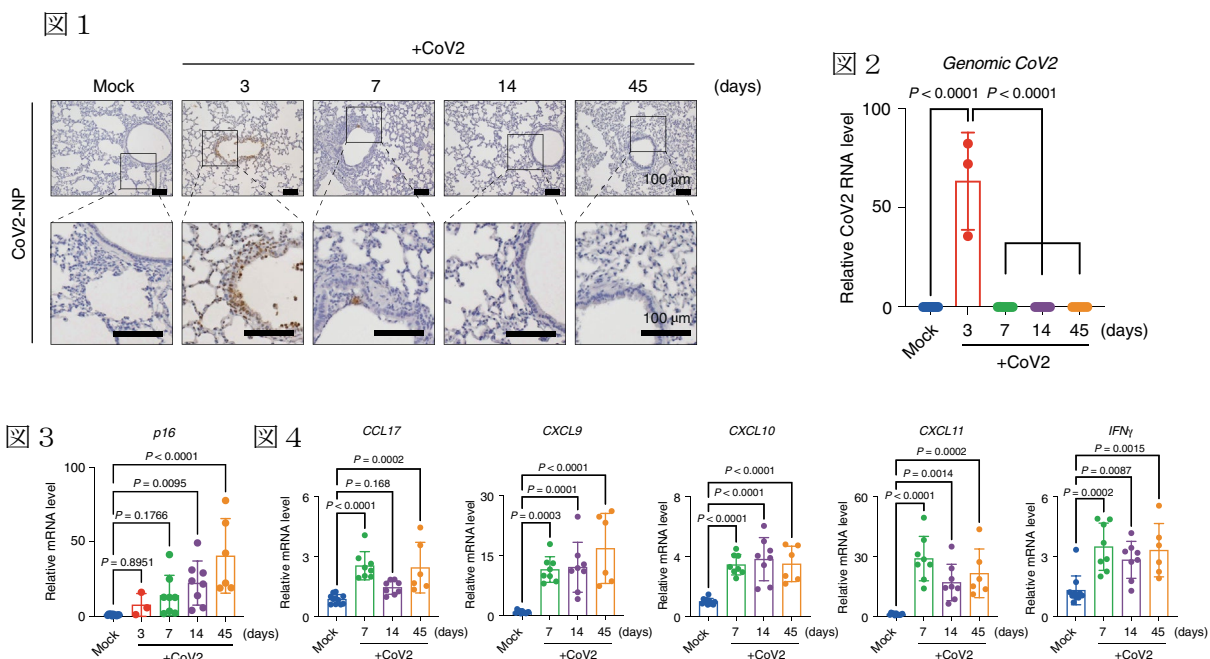


図 1. Syrian hamster に SARS-CoV-2 のイギリス型を感染させ、感染後 3、7、14、45 日で肺組織を回収し、SARS-CoV-2 nucleocapsid protein を認識する抗体を用いて、免疫組織染色により SARS-CoV-2 の感染を確認した。

図 2. Syrian hamster に SARS-CoV-2 のイギリス型を感染させ、感染後 3、7、14、45 日で肺から RNA を抽出し、RT-qPCR を用いて、SARS-CoV-2 の感染を確認した。

図 3. Syrian hamster に SARS-CoV-2 のイギリス型を感染させ、感染後 3、7、14、45 日で肺から RNA を抽出し、RT-qPCR を用いて、細胞老化マーカー遺伝子である p16 の発現を検討した。

図 4. Syrian hamster に SARS-CoV-2 のイギリス型を感染させ、感染後 3、7、14、45 日で肺から RNA を抽出し、RT-qPCR を用いて、SASP 因子である CCL17、CXCL9、CXCL10、CXCL11、IFNγ の発現を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuji S, Minami S, Hashimoto R, Konishi Y, Suzuki T, Kondo T, Sasai M, Torii S, Ono C, Shichinohe S, Sato S, Wakita M, Okumura S, Nakano S, Matsudaira T, Matsumoto T, Kawamoto S, Yamamoto M, Watanabe T, Matsuura Y, Takayama K, Kobayashi T, Okamoto T, Hara E	4. 巻 2
2. 論文標題 SARS-CoV-2 infection triggers paracrine senescence and leads to a sustained senescence-associated inflammatory response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 115-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-022-00170-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shunya Tsuji, Shohie Minami, Rina Hashimoto, Tatsuya Suzuki, Miwa Sasai, Shiho Torii, Chikako Ono, Shintaro Shichinohe, Shintaro Sato, Masahiro Yamamoto, Tokiko Watanabe, Yoshiharu Matsuura, Kazuo Takayama, Takeshi Kobayashi, Toru Okamoto, Eiji Hara
2. 発表標題 SARS-CoV-2 infection triggers paracrine senescence and leads to a sustained senescence-associated inflammatory response
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunya Tsuji
2. 発表標題 SARS-CoV-2 and cellular senescence
3. 学会等名 The 17th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 辻竣也、原英二	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 辻竣也、原英二	4. 発行年 2023年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 6
3. 書名 炎症と免疫	

〔産業財産権〕

〔その他〕

新型コロナウイルスの感染は細胞老化を引き起こすことで炎症反応が持続することを発見
<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/achievement/research/2022/167>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------